

Aus dem Pharmakologischen Institut in Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. W. Schmid

Zur Hemmung des Hexobarbitalabbaus in der Leber durch Chloramphenicol und seine Abbauprodukte

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Ruth Knist
aus Quakenbrück

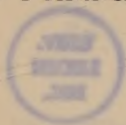
Marburg 1967

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Aus dem Pharmakologischen Institut in Marburg

Direktor: Prof. Dr. med. W. Schmid

Zur Hemmung des Hexobarbitalabbaus in der Leber durch Chloramphenicol und seine Abbauprodukte



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Ruth Knist

aus Quakenbrück

Marburg 1967

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg



Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am: 10. 8. 1967

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät.

Dekan: Prof. Dr. Dr. H. Heuser

Referent: Prof. Dr. W. Schmid

Correferent: Prof. Dr. W. Kunz

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor
Dr. W. S c h m i d, möchte ich für die Anre-
gungen und die freundliche Hilfe und Anleitung
bei der Arbeit danken.

Auch Herrn Professor Dr. W. K u n z danke ich
für die Übernahme des Correferates.

Inhaltsverzeichnis.

	Seite
A. Einleitung.	1
B. Methodik.	3
C. Versuche zum Nachweis von Chloramphenicolabbauprodukten	8
D. Versuche zur Hemmung des Hexobarbitalabbaus in vitro.	13
E. Diskussion.	22
F. Zusammenfassung.	28

Literaturverzeichnis.

Anhang: Tabellen.

A. Einleitung.

Das Antibiotikum Chloramphenicol fällt durch seine besondere chemische Konstitution auf. Es enthält die für ein Naturprodukt außerordentlich seltene Dichloressigsäure; auch das Vorhandensein einer Nitrophenylgruppe ist ungewöhnlich.

Obwohl aromatische Nitroverbindungen wegen ihrer Met-Hb-Bildung durch eine hohe akute Giftigkeit gekennzeichnet sind und außerdem durch chronische Toxizität eine Schädigung des hämatopoetischen Systems zur Folge haben, besitzt Chloramphenicol im Vergleich dazu eine erstaunlich große therapeutische Breite.

Immerhin ist auch beim Chloramphenicol das Bild der Agranulocytose häufig anzutreffen. Ob man dies mit der Nitrophenylgruppe in Zusammenhang bringen darf, ist fraglich. Eine Besonderheit finden wir beim Neugeborenen. Hier kommt es bei zu hoher Dosierung in einem großen Prozentsatz zu einer tödlichen Vergiftung. Diese wird darauf zurückgeführt, daß wegen der geringen Aktivität der Glucuronidtransferasen das Chloramphenicol nicht gekoppelt und damit auch nicht entgiftet werden kann. Weiterhin sind bei Säuglingen und Kleinkindern Vergiftungsfälle bekannt, bei denen therapeutische Chloramphenicoldosen zusammen mit anderen Medikamenten gegeben worden waren. Wenn diese Fälle im einzelnen auch nicht geklärt worden sind, so kann doch vermutet werden, daß hier eine in den letzten Jahren mehrfach beobachtete Wirkung des Chloramphenicol eine Rolle spielt, nämlich die Hemmung mikrosomaler Umbauvorgänge in der Leber. Diese Wirkung ist auch am Tier vorhanden. Voraus-

gegangene Versuche des Instituts hatten ergeben, daß der Abbau von Hexobarbital schon durch Dosen gehemmt wird, die - auf den Menschen bezogen- im therapeutischen Bereich liegen. Die unterste Dosis bei der Maus lag bei 5 mg/kg. In parallellaufenden Versuchen war für das Ganztier gezeigt worden, daß die Beeinflussung der Lebermikrosomen nur durch das Gesamtmolekül Chloramphenicol hervorgerufen wird und daß auf jeden Fall die Entfernung der Dichloressigsäure diesen Effekt aufhebt.

Chloramphenicol wird in der Leber zum großen Teil an Glucuronsäure gekoppelt - wobei die Nitrogruppe intakt bleibt - und entgiftet. Ein gewisser Anteil, der von Tierart zu Tierart schwankt, wird zur Amidogruppe reduziert. Es ist nun zu vermuten, daß gerade bei der Reduktion des Chloramphenicol wirksame Zwischenstufen wie etwa Nitroso- oder Hydroxylaminverbindungen verantwortlich für die Hemmung mikrosomaler Fermente sind; möglicherweise in Analogie zu den Abbaustufen des Anilins, bei dem das Nitrosobenzol bzw. Phenylhydroxylamin in einem Kreisprozeß die Met-Hb-Bildung in den Erythrocyten herbeiführt. Vorversuche am Ganztier hatten allerdings keinen Anhaltspunkt für das Vorhandensein solcher Zwischenprodukte gegeben; eine Aminverbindung war gefunden worden.

Um eindeutige Ausgangsverhältnisse zu schaffen, wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit auf Leberschnitte übergegangen. An ihnen wurde der Abbau von Hexobarbital und seine Beeinflussung durch Chloramphenicol und die verschiedenen Komponenten des Moleküls geprüft, und zwar sowohl bei Inkubation in vitro wie auch nach Vorinjektion in vivo.

Daneben liefen die Versuche weiter, etwaige reduktive Vorgänge am Chloramphenicolmolekül zu erfassen.

B. Methodik.

Als Versuchstiere dienten bei der Hexobarbitalabbaubestimmung männliche Albinoratten. Die Ratten wogen 360 bis 420 g. Das Leberfrischgewicht lag zwischen 10 und 15 g.

Bei den Versuchen zur Bestimmung der Chloramphenicolabbaustufen wurden außerdem männliche Albinomäuse verwendet.

Die Tiere wurden mit Äther leicht narkotisiert. Die Halsgefäße wurden durchschnitten und die Tiere ausgeblutet. Die Lebern wurden sofort entfernt und in vorgekühlte Tyrodelösung gelegt. Inkubiert wurden zur Bestimmung des Hexobarbitalabbaus Leberschnitte, die ca. 1 mm dick waren. Zur Bestimmung von Chloramphenicolabbauprodukten wurden Leberschnitte und verschiedene Fraktionen von Leberhomogenat verwendet, die durch Zentrifugieren gewonnen wurden. Für die Herstellung des Homogenats, die bei 0° C ausgeführt wurde, wurden die Lebern grob zerkleinert und mit eiskühler Tyrode, die 1 % Nicotinsäureamid enthielt, gepottert. Die Tyrodemenge entsprach dem 5 - fachen des Leberfrischgewichts. Das Homogenat wurde zur Entfernung grober Partikel der Kerne und der Mitochondrien 15 Minuten bei 10.000 x g zentrifugiert. Dieses so gereinigte Homogenat stellte die Fraktion A dar. Zum Teil wurde diese Fraktion A 60 Minuten bei 100.000 x g zentrifugiert. Die sich dabei absetzenden Mikrosomen und der Überstand bildeten die Fraktion B. Die Mikrosomen wurden zur Inkubation in Tyrode suspendiert.

Bei beiden Fraktionen entsprach 1 ml 200 mg Leberfrischgewicht.

Im Inkubationsgefäß war enthalten:

1. bei der Bestimmung des Hexobarbitalabbaus:
 - 0,4 g Leberschnitt
 - 3 ml Tyrode
 - 300 γ Hexobarbital - Na
 - 100 - 300 γ Chloramphenicol bzw. andere Testsubstanzen;
2. bei der Bestimmung der Chloramphenicolabbauprodukte:
 - wie unter Ziffer 1. und
 - 2 - 2,5 ml der Fraktion A
 - 2 - 2,5 ml Mikrosomensuspension oder Überstand der Fraktion B
 - 0,3 ml eines TPNH-haltigen und -regenerierenden Systems
 - 1 ml Tyrode, in der 1.000 - 2.000 γ Chloramphenicol bzw. Nitrophenol gelöst war.

Die Tyrodelösung enthielt die üblichen Bestandteile.

Zusammensetzung der Fermentlösung, die zur Fraktion A, zur Mikrosomensuspension und zum Überstand hinzugefügt wurde:

- 0,1 ml TPN (1 %) (Boehringer)
- 0,1 ml Glucose - 6 - Phosphat (1 %)
- 0,005 ml Hexokinase 1 : 1 verdünnt " Sigma "
- 0,005 ml Glucose - 6 - phosphatdehydrogenase 1 : 1 verdünnt.

Lösungsmittel der einzelnen Substanzen:

Hexobarbital - Na	gelöst in Tyrode
Chloramphenicol	" " "
D - 1 - 1 (p - Nitrophenyl)	
-2-amino-1,3-propandiol	" " "
D - 1 - 1 (p - Aminophenyl)	
-2-amino-1,3-propandiol	" " "

α -Acetamido-p-Nitroacetophenon: 15 mg gelöst in
2 ml 0,1 n HCl, aufgefüllt mit Tyrode
auf 100 ml

α -Acetamido- β -hydroxy-p-Nitropropiofenon: 15 mg
gelöst in 1,2 ml 0,1 n HCl, aufge-
füllt mit Tyrode auf 100 ml.

Versuchsanordnung bei der Inkubation:

Die Inkubation wurde in einem Warburg-Gerät der
Firma Braun, Melsungen ausgeführt.

1. Der Hexobarbitalabbau wurde bei 37⁰ C, die Ver-
suche zum Abbau des Chloramphenicol bei 37,5⁰ C
durchgeführt.

(Lit.: 1, 2)

2. Die Ansätze mit Hexobarbital wurden durch Zu-
gabe von 1 ml 6%iger Perchlorsäure unterbrochen.
Bei den Versuchen zum Abbau von Chloramphenicol,
Nitrobenzol und Nitrophenol unterblieb diese
Unterbrechung, um eine eventuelle Farbreaktion
nicht zu stören.

3. Bei Vorinjektion der Substanzen in vivo betrug
die Dosis jeweils 25 mg/kg Körpergewicht; die
Injektion erfolgte sc. Kontrolltieren wurde
das jeweilige Lösungsmittel der Substanzen in
entsprechender Konzentration injiziert.

Die Hexobarbitalbestimmung wurde nach der Methode
für die Pentobarbitalbestimmung für Plasma und
Urin nach Brodie und Bruns durchgeführt.

(Lit.: 3)

Reagenzien:

1. Phosphatpuffer pH-5,5, gewaschen in Petroläther,
der mit 1,5 % Isoamylalkohol versetzt ist.

Herstellung:

16 Teile n/10 primäres Na- oder K-Phosphat
nach Sörensen,

1 Teil n/10 sekundäres Na- oder K-Phosphat
nach Sörensen.

2. Petroläther (Siedebereich $60 - 70^{\circ} \text{C}$),
der einmal in 1 n NaOH, einmal in 1 n HCl
und zweimal mit aqua dest. im Scheidetrichter
gewaschen ist, wird mit 1,5 % Isoamylal-
kohol versetzt.
3. pH - 11 Puffer: 8,5 ml 10 n NaOH + 200 ml
0,8 m Na_2HPO_4 (wird im pH - Meter einge-
stellt).

Methode:

1. Die Inkubationsmischung wird mit 1,5 g NaCl,
1 ml pH - 5,5 Puffer und mit 60 ml Petrol-
äther, der 1,5 % Isoamylalkohol enthält,
versetzt.
2. 45 Minuten auf der Schüttelbank geschüttelt.
3. 10 - 20 Minuten zentrifugieren; die dabei
verlorene Petroläthermenge wird nachher er-
setzt.
4. 40 ml Petroläther abpipettieren und 4 ml
pH - 11 Puffer hinzugeben.
5. 3 Minuten schütteln.
6. 10 Minuten zentrifugieren.
7. Petroläther absaugen und die darunter lie-
gende wäßrige Phase im UV - Licht messen
(bei $240 \text{ m}\mu$).

Eichkurve für Hexobarbital - Na (bei $240 \text{ m}\mu$
im UV - Licht).

4 ml pH - 11 Puffer und 1 ml Standardlösung.

Herstellung der Standardlösung:

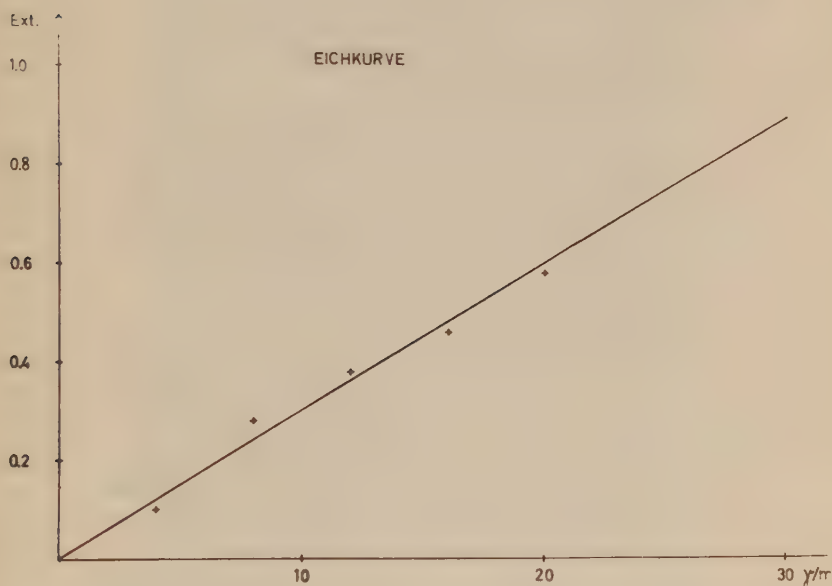
10 mg Hexobarbital werden in 3 ml 0,1 n NaOH
gelöst und mit H_2O zu 100 ml verdünnt.

Die Extinction ist proportional der Hexobarbital-
konzentration.

Hexobarbitalkon- zentration in mg/ml .	20	16	12	8	4
Extinction	0,57	0,46	0,38	0,28	0,1

Die Ausbeute für die Eichkurve nach dem Verfahren von Brodie und Bruns betrug ca. 80 %.

Ein Zusatz von Chloramphenicol, Perchlorsäure und Tyrode bewirkten keine Extinctionsänderung bei der Hexobarbitalbestimmung.



C. Versuche zum Nachweis von Chloramphenicol-
abbauprodukten.

I. Zum Nachweis von Nitrosoverbindungen.

A. Farbreaktionen in vitro.

1. Nachweis mit Natriumpentacyanoamminoferrat II (Fearrons - Reagens).

a) Reagenzglasversuche.

Da gesicherte Befunde über die Nachweisbarkeit von Nitrosobenzol in vivo und in vitro vorliegen, arbeiteten wir die Nachweise nach. Dazu wurden Phenylhydroxylamin und Nitrosobenzol nach den üblichen Methoden hergestellt.

(Lit.: 4, 5, 20).

Nach Otsuka soll Nitrosophenol mit wäßriger 0,1%iger Natriumpentacyanoamminoferrat II - Lösung eine olivgrüne Farbreaktion ergeben. Über die Grenze der Nachweisbarkeit, d.h. über die Empfindlichkeit der Reaktion, ist in der Literatur nichts Näheres zu erfahren.

Chloramphenicol ergab bei Erwärmung in angesäuerter Lösung mit dem Reagens eine amethystfarbene Färbung (kein Niederschlag). Kontrolle: angesäuertes Reagens erwärmt, wird moosgrün. Wird Chloramphenicol einige Sekunden mit Ammoniumchlorid und Zink reduziert, so bildet sich ein violetter Niederschlag. Eine Extraktion des violetten Niederschlags zur näheren Analyse ist nicht gelungen.

b) Inkubationsversuche.

Zur Bestimmung einer Reduktionsabbaustufe der Nitrophenylgruppe in vitro

wurden vorzugsweise Albinomäuselebern wegen der größeren Aktivität der Nitroreduktase verwendet. (Lit.: 6).

Es wurden 1.000 μ Chloramphenicol bzw. Nitrophenol bzw. Nitrobenzol inkubiert. Die Versuche wurden nach 7, 10, 15, 30 und 60 Minuten unterbrochen. Danach wurde 10 - 15 Minuten zentrifugiert. 3 ml des klaren Überstandes werden mit 0,2 ml einer 0,01%igen Natriumpentacyanoamminoferrat II - Lösung versetzt. Das Intensitätsmaximum der Farbreaktion soll nach 30 Minuten erreicht werden. Wie auch in anderen Nacharbeiten (Lit.: 7) fanden wir keinen sichtbaren Nachweis für Nitrosogruppen. Modifikation der Versuchsanordnung durch Hinzufügen des Reagens während der gesamten Inkubationszeit änderte am Resultat nichts. Insgesamt wurden 9 Versuche durchgeführt.

Da es Otsuka gelungen war, einen chromatographischen Nachweis mit Fearrons - Reagens zu führen, versuchten wir, einen ähnlichen Nachweis nachzuarbeiten.

Methodik:

Dünnschichtchromatographie: (Lit.: 8)

Sorptionsschicht: Kieselgel HF und Cellulose.

Laufmittel: n - Butanol, Essigsäure,
 H_2O gesättigt (4+1+5).

Laufzeit: 90 Minuten.

Entwicklung: 1. UV - Licht

2. Übersprühen mit 0,5 n NaOH und 0,02 Natriumpentacyanoamminoferrat II - Lösung.

Nach 7, 10 und 30 Minuten - langer Inku-

bationszeit wurde die Inkubationsmischung im Rotationsverdampfer eingeengt und aufgetragen. Entsprechende Kontrollversuche wurden durchgeführt. Nitrosoverbindungen konnten nicht nachgewiesen werden. Ca. 1.000 μ Nitrosobenzol, das zur Kontrolle mitaufgetragen worden war, war mit Fearrons - Reagens nicht nachweisbar. Im UV - Licht waren Absorptionsflecke sichtbar. R - f - Wert: 0,7. Insgesamt wurden 5 Versuche durchgeführt.

2. Nachweis nach der Methode von Kiese und Herr. (Lit.: 9).

Es wurden 1.000 - 2.000 μ Chloramphenicol bzw. Nitrobenzol bzw. Nitrophenol inkubiert. Die Versuche wurden nach 7, 15, 30, 45 und 60 Minuten Inkubationszeit unterbrochen.

- a) Die Inkubationsmischung wird mit 6 ml Tetrachlorkohlenstoff 10 Minuten auf der Schüttelbank stark geschüttelt.
- b) 10 Minuten bei 2.900 U/Min. zentrifugieren.
- c) Die wäßrige Phase wird abgesaugt.
- d) Der Tetrachlorkohlenstoff wird zweimal mit 10 ml 0,05 n H_2SO_4 auf der Maschine durch Schütteln gewaschen. H_2SO_4 wird abgesaugt, und die Gefäßwände werden zweimal mit H_2O gewaschen. H_2O wird abgesaugt.
- e) Tetrachlorkohlenstoff wird mit 2 ml Eisessig und 0,1 ml 20%iger wäßriger Natriumnitritlösung versetzt und im Laufe von 15 Minuten dreimal kräftig durchgeschüttelt.
- f) Die überschüssige salpetrige Säure wird mit 0,2 ml 50%iger wäßriger Ammoniumsulfatlösung versetzt. Die Ansätze werden mehrmals kräftig durchgeschüttelt.
- g) 10 Minuten stehenlassen.

- h) 3 Tropfen 0,5%iger α -Naphthylendiammoniumchlorid - Lösung zusetzen, kurz durchschütteln und 2 Stunden im Dunkeln halten.
- i) Der Azofarbstoff befand sich in dem von Tetrachlorkohlenstoff getrennten Gemisch von Eisessig und Wasser.

Nach dieser Methode waren Nitrosophenol und Nitrosobenzol nach Inkubationszeiten von 10, 30 und 60 Minuten nachweisbar. Beide Nitrosoverbindungen ergaben einen roten Azofarbstoff. Ein entsprechendes Abbauprodukt des Chloramphenicol ließ sich mit der Methode nicht nachweisen. Eine Änderung der Versuchsanordnung durch Ausschütteln der eventuell vorhandenen Nitrosoverbindungen im Isoamylalkohol führte ebenfalls zu keinem Erfolg. Desgleichen ergab ein Überströmen mit NO und NO₂ zur Diazotierung und nachfolgende Bindung der schwefligen Säure mit Acetatpuffer pH - 4,5 ein negatives Ergebnis.

II. Zum Nachweis von Nitro- und Aminverbindungen. Da beim dünnsschichtchromatographischen Nachweis zur Bestimmung von Chloramphenicolabbaustufen 2 Absorptionsflecke im UV - Licht sichtbar waren, wurde zur näheren Identifizierung noch ein dünnsschichtchromatographischer Nachweis von Nitro- und Aminverbindungen durchgeführt.

Methodik:

Sorptionsschicht: Kieselgel HF.

Laufmittel: Methylenchlorid-Methanol-Ammoniak
(80+20+3)

Laufzeit: 30 Minuten.

Entwicklung: 1. UV - Licht.

2. nach Glazko, Dill, Rebstock
(Lit.: 10)

- a) Übersprühen mit 1 : 10 Verdünnung 15 % Titanchloridreagens in 1 n HCl. Die Platte wird feucht in einen mit Brom gesättigten Zylinder gestellt. Nach dem Trocknen der Platte
- b) Übersprühen mit einer Mixtur aus 10 Teilen Butylnitrit, 5 Teilen n - Butanol, 1 Teil Eisessig.
- c) 2 Minuten stehenlassen und dann mit einer 0,1 % Äthylendiammin-dihydrochlorid - Lösung in einer Mixtur von 9,5 ml n - Butanol und 0,5 ml 2 n HCl übersprühen.

Nitroverbindungen werden rot. Wird die Platte nicht mit Titanchlorid reduziert, so stellen sich die Aminverbindungen blau dar.

Beide Absorptionsflecke konnten als Nitroverbindungen identifiziert werden. R - f - Werte: 0,5 und 0,92. Reines Chloramphenicol in Tyrode gelöst, hatte einen R - f - Wert von 0,5.

Aminverbindungen traten nach der kurzen Inkubationszeit - bis zu 60 Minuten - ~~nicht~~ erwartungsgemäß nicht auf.

D. Versuche zur Hemmung des Hexobarbitalabbaus
in vitro.

Zur Bestimmung des Hexobarbitalabbaus wurden nur die Lebern männlicher Albinoratten verwendet, da sie -nach Remmer- eine höhere Aktivität als die weiblicher Tiere aufweisen. (Lit.: 11) Der auffallende Unterschied gegenüber weiblichen Albinoratten konnte von uns bestätigt werden. Die von uns verwendeten Leberschnitte männlicher Tiere bauten im Durchschnitt nach 60 Minuten von den vorgelegten 300 μ Hexobarbital pro Ansatz 197,8 μ -ca. 65,6 % ab. (Abb. 1; Tab. 1)

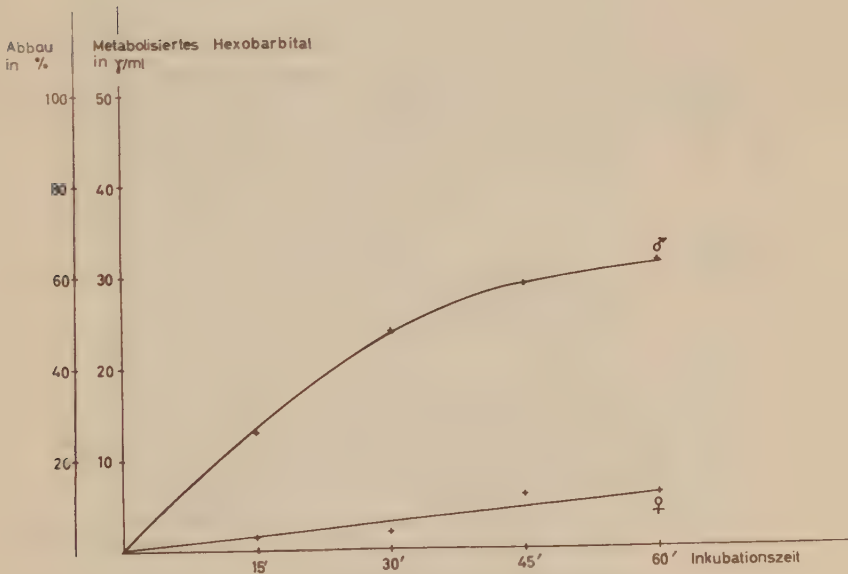


Abb.1: Unterschiedlicher Hexobarbitalabbau im Verlauf einer Inkubationszeit von 60 Minuten in Leberschnitten männlicher und weiblicher Albinoratten.

1. Der Hexobarbitalabbau nach Injektion der
Prüfsubstanzen in vivo. (Abb. 3; Tab. 3,4)

a) Chloramphenicol.

Die Tiere erhielten die Substanz
25 mg/kg sc. eine oder zwei Stunden vor
der Tötung. Nach 1-stündiger Voraussage
erwies sich der Hexobarbitalabbau um etwa
50 % gehemmt. In den ersten 15 - 30 Inku-
bationsminuten war die Hemmung sogar noch
stärker. Nach 2-stündiger Vorinjektion wur-
de eine wesentlich geringere, aber noch
deutliche Hemmung von ca. 30 % nachge-
wiesen.

b) α -Acetamido- β -hydroxy- p -Nitropropio-
phenon.

Bei dieser Substanz, die eine Stunde vor
der Tötung gegeben wurde, wurde ebenfalls
eine Hemmung des Hexobarbitalabbaus fest-
gestellt. Sie lag nach 30 Minuten bei
ca. 58 %, nach 60 Minuten bei ca. 35 %.

c) D - 1 - 1 - (p -Nitrophenyl) - 2 -
amino - 1,3 propandiol.

Nach Vorinjektion dieser Substanz
lag nur eine geringe Hemmung gegenüber
dem Kontrolltier vor. Nach 60 Minuten
Inkubationszeit betrug sie ca. 21 %.

d) α -Acetamido - p - Nitroacetophenon.

Nach Injektion dieser Substanz wur-
de keine Hemmung des Hexobarbitalabbau-s
festgestellt.

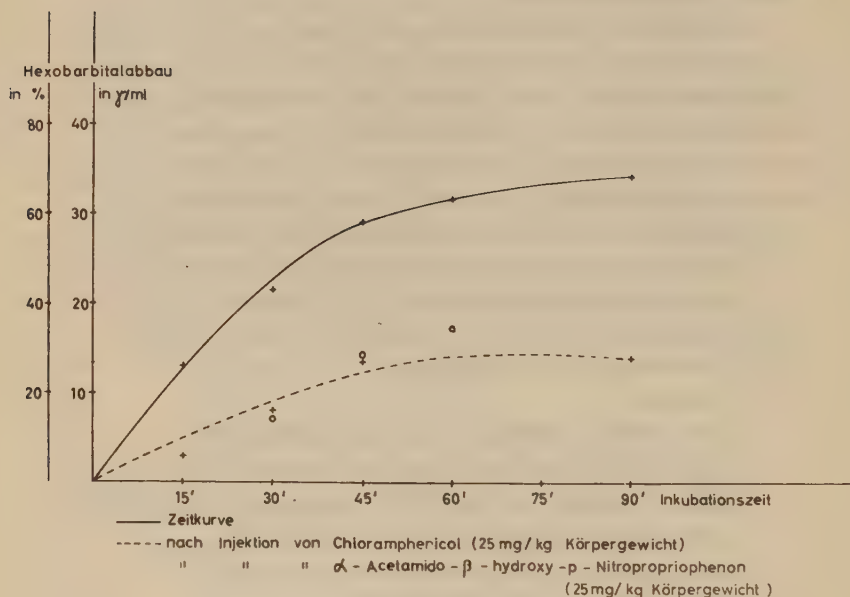


Abb.3: Die Beeinflussung des Hexobarbitalabbaus in Leberschnitten nach Injektion mit verschiedenen Testsubstanzen.

2. Der Hexobarbitalabbau bei Inkubation der Leberschnitte mit den Prüfsubstanzen in vitro.

a) Gleichzeitiger Zusatz von Prüfsubstanzen und Hexobarbital. (Tab. 5)

Wurde Chloramphenicol gleichzeitig mit Hexobarbital der Inkubationslösung zugesetzt, so ergab sich gegenüber dem Kontrollansatz keine oder nur eine geringe Hemmung im Hexobarbitalabbau. Bei Erhöhung der Chloramphenicoldosis von 100 μ g auf 300 μ g

war die Hemmung etwas stärker. Sie stand jedoch in keinem Verhältnis zu der Hemmung nach Vorinjektion von Chloramphenicol.

Eine gleichzeitige Inkubation von D-1-1-(p-Nitrophenyl)-2-amino-1,3-propandiol und Hexobarbital zeigte in einer Dosis von 100 μ ebenfalls keine Hemmung des Hexobarbitalabbaus.

Da angenommen wurde, daß die Hemmung des Hexobarbitalabbaus erst durch Metabolisierung verursacht sein könnte, wurden 100 μ D-1-Threo-1-(p-Aminophenyl)-2-amino-1,3-propandiol gleichzeitig mit Hexobarbital inkubiert. Der Versuch ergab jedoch keine Hemmung des Hexobarbitalabbaus im Verlauf der Inkubationszeit von 60 Minuten.

b) Vorinkubation der Schnitte mit Prüfsubstanzen. (Abb. 4; Tab. 6 - 8)

aa) Vorinkubation von 30 Minuten in Sauerstoffatmosphäre mit Chloramphenicol bewirkte in der Dosis von 100 μ nach 30 Minuten Hexobarbitalinkubationszeit eine geringe Hemmung. Diese steigerte sich auch nach 60 Minuten nicht wesentlich. Da aus Versuchen mit Nitrobenzol und Nitrophenol bekannt ist, daß in Stickstoffatmosphäre vorwiegend bis zur Nitrosostufe und nicht wie in Sauerstoffatmosphäre bis zur Aminstufe reduziert wird, wurden weitere Versuche bei Vorinkubation in Stickstoff durchgeführt. (Lit.: 12,13) Nach einer Vorinkubation in Stickstoff zeigte dieselbe Chloramphenicoldosis nach 30 Minuten Hexobarbitalinkuba-

tionszeit eine geringe Erhöhung der Hemmung. Nach 60 Minuten Inkubationszeit betrug sie aber mehr als das Doppelte der Hemmung, die nach einer Vorinkubation unter Sauerstoff entstanden war.

Eine Steigerung der Chloramphenicol-dosis auf 300 μ g ergab sowohl bei einer Vorinkubation unter Sauerstoff als auch unter Stickstoff eine gleich starke Hemmung des Hexobarbitalabbaus. Sie entsprach annähernd der Hemmung, die auch nach Vorinjektion von Chloramphenicol gefunden worden war.

Durch eine Verlängerung der Vorinkubationszeit in Sauerstoff auf 60 Minuten wurde bei einer Dosis von 100 μ g Chloramphenicol der Hexobarbitalabbau im Verlauf von 60 Minuten Inkubationszeit nicht nennenswert gehemmt. Dagegen trat bei 300 μ g Chloramphenicol eine erhebliche Hemmung des Hexobarbitalabbaus ein. Diese Hemmung war nach einer Vorinkubation in Stickstoff etwas stärker als in Sauerstoff.

Bei der Mehrzahl der Versuche wurde die Hemmung des Hexobarbitalabbaus mit zunehmender Inkubationszeit geringer. Diese Abnahme ist bei einer Dosis von 100 μ g Chloramphenicol ausgeprägter als bei einer Dosis von 300 μ g.

- bb) D-1-1-(p-Nitrophenyl)-2-amino-1,3-propandiol hemmt den Hexobarbitalabbau nicht, und zwar weder nach Vorinkubation in Sauerstoff- noch in Stickstoffatmosphäre. Eine Steigerung der Dosis bis zu 600 μ g änderte an diesem Resultat nichts.

Diese Steigerung der Konzentration wurde auch deshalb erforderlich, weil die Substanz nur in einer L(+) und in einer D-l($\pm$) Konfiguration vorlag und Chloramphenicol nur die D(-) Konfiguration aufweist. Dennoch hätte eine Steigerung bis zu 600% der Substanz mit D-l($\pm$) Konfiguration eine deutlichere Hemmung ähnlich der der nachfolgenden Substanzen aufweisen müssen, da diese Dosis die D(-) Form in genügender Menge enthalten haben müßte.

- cc) Vorinkubation der reduzierten Form D-l-threo-1-(p-Aminophenyl)-2-amino-1,3-propandiol hemmt den Hexobarbitalabbau in einer Konzentration von 100% pro Ansatz nicht. Da nach vorausgehenden Untersuchungen nur ein sehr geringer Anteil von Chloramphenicol zu einem Aminophenylderivat reduziert wird, hätte die gegebene Menge ausreichen müssen, wenn sie die hemmende Wirkform ist. Aus diesem Grund unterblieb eine weitere Steigerung der Dosis.
- dd) Nach Vorinkubation in Sauerstoffatmosphäre hemmt α -Acetamido-p-Nitroacetophenon den Hexobarbitalabbau schon in einer Dosis von 100% erheblich. Eine Erhöhung der Dosis auf 300% steigert die Hemmung noch beträchtlich. Im Verlauf der Inkubationszeit von 60 Minuten nahm, wie beim Chloramphenicol selbst, die Hemmung des Hexobarbitalabbaus ab, und zwar bei einer Dosis 300% ausgeprägter als bei einer Dosis von 100%.

Auch bei Vorinkubation unter Stickstoff war der Hexobarbitalabbau bei einer Dosis von 100 μ nach 30 Minuten Hexobarbitalinkubation deutlich gehemmt, und zwar etwas stärker als unter Sauerstoff. Die Hemmung nimmt im Verlauf der Inkubationszeit von 60 Minuten erheblich ab.

Eine Steigerung der Dosis auf 300 μ bewirkte ebenfalls eine Zunahme der hemmenden Wirkung. Diese ging jedoch im Verlauf der Hexobarbitalinkubationszeit von 60 Minuten nicht so stark zurück wie unter Sauerstoff.

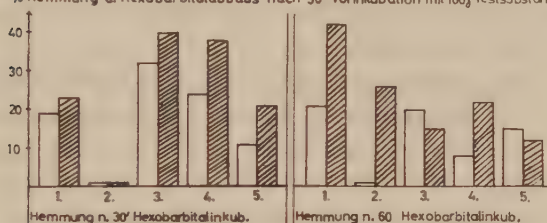
Im Gegensatz hierzu stehen die Ergebnisse nach Injektion von α -Acetamido-p-Nitroacetophenon, wo keine Hemmung des Hexobarbitalabbaus in vitro festgestellt werden konnte.

- ee) Von α -Acetamido- ~~β~~ -hydroxy-p-Nitro-propiophenon bewirkt Vorinkubation in Sauerstoffatmosphäre in einer Dosis von 100 μ nur eine mäßige Hemmung des Hexobarbitalabbaus. Dieselbe Dosis verursachte aber bei Vorinkubation unter Stickstoff eine starke Hemmung. Wie bei den anderen Versuchen war die Hemmung bei der höheren (300 μ) Dosis nach Inkubation in Stickstoff gegenüber der in Sauerstoff nicht größer.
- ff) Um weitere Anhaltspunkte über die Bedeutung der Nitrophenylgruppe für die Hemmwirkung des Chloramphenicol zu erhalten, wurde Nitrobenzol in unsere Versuche miteinbezogen. Diese Substanz wird durch die Lebermikrosomen über Nitrosobenzol zu Anilin reduziert. (Lit.:14) Vorinkubation der Substanz in Sauer-

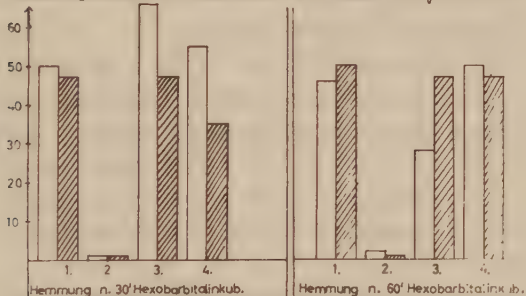
stoffatmosphäre bewirkt in einer Konzentration von 100 μ keine deutliche Hemmung des Hexobarbitalabbaus. Dagegen war sie nach vorangegangener Inkubation in Stickstoff stark; sie war nach 15 Minuten Hexobarbitalinkubationszeit am höchsten, und zwar betrug sie ca. 54 %.

Abb. 4

% Hemmung d. Hexobarbitalabbaus nach 30' Vorinkubation mit 100 μ Testsubstanz



% Hemmung d. Hexobarbitalabbaus nach 30' Vorinkubation mit 300 μ Testsubstanz



TESTSUBSTANZEN:

1. Chloramphenicol
2. D-1-1 - (p-Nitrophenyl)-2-amino-1,3-propanediol
3. α -Acetamido - p-Nitroacetophenon
4. α -Acetamido - β -hydroxy - p-Nitropropiophenon
5. Nitrobenzol

□ N₂ - ■ N₂-Atmosphäre

E. Diskussion.

1. Zur Frage der Hemmung des Hexobarbitalabbaus durch Chloramphenicol und Teile des Chloramphenicolmoleküls.

Nach dem heutigen Stand der Forschung findet die Entgiftung chemischer Substanzen in der Leberzelle an zwei cytomorphologisch getrennten Stellen statt. Der Leberzelle stehen dafür zur Verfügung:

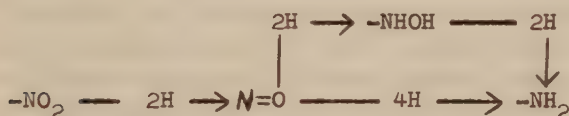
- a) eine Bindung an Glucuron- und Schwefelsäure mit Transferasen, die in der sogenannte-n Plasmafraktion enthalten sind. Diese Kopplung setzt das Vorhandensein von Hydroxyl- oder Oxy- Gruppen am zu koppelnden Molekül voraus. Wenn diese nicht primär vorhanden sind, können sie
- b) durch chemischen Umbau durch Fermente entstehen, die in der Mikrosomenfraktion lokalisiert sind. Darüberhinaus sind in diesem Zellbestandteil weitere Fermente vorhanden, welche Methylierungen, Demethylierungen, Esterspaltungen etc. durchzuführen vermögen.

Chloramphenicol wird vorwiegend durch plasmatische Koppelungsreaktionen inaktiviert. Die Koppelung erfolgt an den alkoholischen Gruppen; die Nitroarylgruppe bleibt dabei intakt. Im Harn des Menschen und im Tierversuch bei Ratten findet sich eine größere Menge dieser gekoppelten Nitroverbindungen, die im einzelnen noch nicht identifiziert sind. Nur geringe Mengen finden sich in Form reduzierter Nitroverbindungen, d.h. Aminverbindungen, im Harn vor. (Lit.: 15) Die Inaktivierung

von Chloramphenicol schließt auch eine Hydrolyse der Amidbindung mit der Seitenkette ein. Geringe Mengen des hydrolysierten Produkts sind im Harn zu finden.

Die Reduktion von Nitrogruppen zu Amingruppen ist ein mikrosomenabhängiger Entgiftungsvorgang, der von einem besonderen, nicht einheitlich definierten Fermentsystem, der sogenannten "Nitroreduktase", verursacht wird. (Lit.: 16)

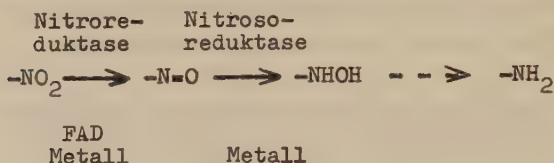
Die Reduktion einer Nitrogruppe in eine Amingruppe geschieht in einer Reaktionskette, bei der ein Umsatz von 6 H⁺ Atomen bewirkt wird und daher sehr wahrscheinlich aus folgenden 2 oder 3 intermediären Schritten besteht: (Lit.: 17)



Als Wasserstoffdonatoren gelten TPNH⁺ und DPNH⁺, wobei TPNH⁺ eine wesentlich größere Aktivität besitzt.

Das "Nitroreduktasesystem" schließt außerdem ein Flavoprotein ein, dessen prosthetische Gruppe durch FMN, FAD und Riboflavin wirksam ersetzt werden kann. Zur näheren Identifizierung ist es Otsuka gelungen, zwei Proteinfractionen durch chromatographischen Ionenaustausch zu trennen. Die erste Fraktion war in der Lage, Nitro- zu Nitroso-(=Nitroreduktase) zu reduzieren, die zweite Fraktion reduzierte Nitroso- zu Amino-(=Nitrosoreduktase). Ferner wurde gefunden, daß nur der erste Schritt Nitro- $\longrightarrow$ Nitroso- sauerstoffempfindlich und von einem Flavinprotein

und von Metallionen abhängig ist.



Ein Versagen der Wasserstoffdonatoren im Sinne einer Überbelastung oder einer Erschöpfung für diesen Vorgang ist nicht anzunehmen, weil durch den Glucose-6-phosphat-Shunt laufend genug TPNH^+ zur Verfügung steht. Es ist danach wenig wahrscheinlich, daß bei Vorliegen von 2 zu ihrem Umbau TPNH^+ verbrauchenden Fremdsubstanzen eine gegenseitige Konkurrenz um den Wasserstoff besteht. Für unsere Beobachtung, daß der Hexobarbitalabbau in vivo und in vitro gehemmt wird, ist ein Vorgang, der an anderen Faktoren der Nitroreduktase eingreift, naheliegender. Dafür spricht auch der Befund, daß in vitro ein durch Chloramphenicol gehemmter Hexobarbitalabbau in Leberschnitten durch einen Überschuß von TPNH^+ nicht normalisiert wird. Es ist deshalb zu diskutieren, ob die Hemmung des Hexobarbitalabbaus nicht durch Hemmung eines Fermentes infolge Bildung eines relativ festen Ferment-Substratkomplexes mit Chloramphenicol oder eines Chloramphenicolabbauprodukts erfolgt. Der Abbau beider Substanzen ist sowohl TPNH^+ - wie Flavoproteinabhängig. Zu denken wäre auch an eine Beteiligung des Magnesiums, das beim Abbau beider Substanzen eine Rolle spielt. Magnesium ist für die Oxydation von Hexobarbital erforderlich, dagegen hemmt es den Abbau von Chloramphenicol. Insgesamt ergeben sich aber aus unseren Versuchen keine Anhaltspunkte für eine Interferenz beider Substanzen.

Zum ersten Teil der Versuchsergebnisse ist zu sagen, daß für die hemmende Wirkung des Chloramphenicol auf den Hexobarbitalabbau vor allem die intakte Nitrophenylgruppe und die säureamidartiggebundene Essigsäure von Bedeutung sind. Weniger ausschlaggebend ist das Vorhandensein der Chloratome in der Essigsäure und einer Hydroxygruppe des Propandiolanteils. Die Hemmung ist unter diesem Gesichtspunkt offenbar nicht allein auf den vermuteten reduzierenden Vorgang an der Nitrogruppe zurückzuführen. Sonst müßten auch andere aromatische Nitroverbindungen wie D-1-1-(p-Nitrophenyl)-2-amino-1,3-propandiol eine Hemmung des Hexobarbitalabbaus in vivo und in vitro hervorrufen; es sei denn, die säureamidartiggebundene Essigsäure bewirke entweder durch den Vorgang der Hydrolyse oder durch ihre Stellung im Molekül eine Labilisierung der Nitrogruppe oder eine Aktivierung des Nitroreduktasesystems.

Interessant ist, daß eine Hemmung des Hexobarbitalabbaus durch α -Acetamido-p-Nitroacetophenon zwar in vitro, nicht aber in vivo zu verzeichnen ist.

Um eine wesentliche Hemmung des Hexobarbitalabbaus in vitro zu erzielen, ist eine relativ hohe Dosis von Chloramphenicol erforderlich. Die niedrige Dosis von Chloramphenicol bei Versuchen in vivo, die nur 1/10 der Hexobarbitaldosis betragen kann, um einen narkoseverlängernden Effekt auszuüben, dürfte auf die verschiedene Verteilung der Substanzen im Körper zurückzuführen sein. Die Hemmung des Hexobarbitalabbaus ist bei gleichbleibender Hexobarbitaldosis der Höhe der Chloramphenicoldosis ungefähr proportional. Bei niedriger

Dosierung ist die Hemmung nach Vorinkubation in Stickstoff- stärker als in Sauerstoff-atmosphäre. Dies stimmt mit Beobachtungen über die Eigenschaft der Nitroreduktase überein. (Lit.: 18)

Daß bei gleichzeitiger Inkubation von Chloramphenicol und Hexobarbital keine nennenswerte Hemmung des Hexobarbitalabbaus auftritt, mag an der verschiedenen Schnelligkeit der Entgiftungsreaktionen liegen.

2. Zur Frage des Nachweises von Chloramphenicolabbauprodukten.

Da der Nachweis von Nitrosoverbindungen sowohl bei Inkubation von Nitrobenzol wie auch von Nitrophenol durch Leberhomogenat in vitro gelungen ist, (Lit.: 19) bestand die berechnigte Annahme, unter ähnlichen Versuchsbedingungen einen Nachweis für entsprechende Abbauprodukte beim Chloramphenicol führen zu können. Schwierigkeiten ergaben sich vor allem daraus, daß Vergleichssubstanzen, wie sie z.B. bei der Identifizierung von Substanzen bei der Dünnschichtchromatographie unentbehrlich sind, fehlten. Ausführliche Versuche, Chloramphenicol mit einer Nitrobenzol- oder Phenylhydroxylamingruppe durch Reduktion oder Synthese zu erhalten, blieben erfolglos. Dies beruht wahrscheinlich auf der ausgesprochenen Labilität dieser Verbindungen. Eine solche Annahme kann durch den Befund gestützt werden, daß sich bei Reduktionen des Chloramphenicol gelbgefärbte Verbindungen in Amylalkohol ausschütteln ließen, die sich beim Einengen jedoch braun verfärbten und als ein uneinheitliches Substanzgemisch erwiesen. In vielen Versuchsreihen wurden nie Flecke gefunden, die

nicht den uns bekannten Chloramphenicolteil-
abbauprodukten entsprachen.

Nachweise aufgrund einer Farbreaktion in vitro
wären eigentlich zu erwarten gewesen. Tatsäch-
lich gelang es uns, Abbaustufen von Nitroben-
zol und Nitrophenol durch Leberhomogenat vo-n
Mäusen nachzuweisen und nach der Methode von
Kiese und Herr als Nitrosoverbindungen zu
identifizieren. Deshalb konnte angenommen
werden, daß diese Methode eine relativ große
Spezifität gegenüber Nitrosoverbindungen auf-
weist.

Trotz vieler Versuchsvariationen (siehe Me-
thodik) gelang es uns in keinem Fall, eine
entsprechende Farbreaktion bei der Chlor-
amphenicolinkubation zu erzeugen. Dieses ne-
gative Ergebnis könnte einerseits darauf be-
ruhen, daß überhaupt keine Reaktion stattfin-
det. Dagegen spricht, daß uns regelmäßig der
Nachweis einer bis zum Anilin reduzierten
Chloramphenicolstufe gelungen war, oder daß,
wie auch die chemischen Versuche gezeigt ha-
ben, die Nitrosoverbindung eine außerordent-
lich labile und kurzlebige Zwischenstufe
ist.

Modifikationen der Methode wurden u.a.
deshalb vorgenommen, weil man vermuten konn-
te, daß mehrmaliges Waschen des Tetrachlor-
kohlenstoffs aufgrund anderer Löslichkeits-
verhältnisse der Nitrosoverbindung des
Chloramphenicol eine Extraktion bewirkt ha-
ben könnte.

F. Zusammenfassung.

An Schnitten aus Lebern von Ratten wurde die Beeinflussung des Hexobarbitalabbaus durch Chloramphenicol und Teile seines Moleküls untersucht.

1. Chloramphenicol führt zu einer Hemmung des Hexobarbitalabbaus, wenn es in *vivo* 1 - 2 Stunden vor der Leberentnahme injiziert wird oder wenn die Leberschnitte mit Chloramphenicol vor der Hexobarbitalzugabe inkubiert werden. Die wirksamen Konzentrationen lagen bei $1 - 3 \cdot 10^{-5}$. Bei Vorinkubation in Stickstoffatmosphäre ist die Hemmwirkung stärker als in Sauerstoffatmosphäre.
2. Unter gleichen Bedingungen wirken nur diejenigen Chloramphenicolvorstufen hemmend, die in C_2 noch mit Acetamid substituiert sind. Zur Hemmwirkung ist weiterhin die Nitrophenylgruppe an C_1 notwendig. Ihre Reduktion zum Anilin hebt die Hemmwirkung auf. In vitro kann auch das C_3 - Atom entbehrt werden. Im Gegensatz dazu ist dieses Acetophenonderivat in vivo ohne Wirkung.
3. Einen ähnlich starken Hemmeffekt ergibt auch die anaerobe Inkubation von Nitrobenzol in einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-5}$. Hier wurde gleichzeitig das Entstehen von Nitrosobenzol gefunden. Es wird angenommen, daß auch bei den wirksamen Chloramphenicolvorstufen und Chloramphenicol selbst eine solche Reduktionsstufe für die Hemmung des Hexobarbitalabbaus wirksam ist, obwohl ihr Entstehen nicht nachweisbar war.

Literaturverzeichnis.

- The Journal of Pharmacol. and Experiment Therapeutics.
- 1) Cooper, Brodie : The enzymatic Metabolism of Hexobarbital. Vol.114, S.409 ff (1955)
- 2) Fouts, Brodie : The enzymatic Reduction of Chloramphenicol, P-Nitrobenzoic Acid and other aromatic Nitro Compounds in Mammels. Vol.119, S.197 ff.(1956)
- 3) Brodie et al. : The fate of Pentobarbital in Man and Dog and a method for its estimation in Biological material. Vol. 109, S.27 ff. (1953)
- 6) wie 2)
- 15) Glazko et al. : Biochemical Studies on Chloramphenicol. Vol.96, S. 445 ff. (1949)
- Archiv für exp. Pathologie und Pharmakologie.
- 4) Herr, Kiese : Bestimmung von Nitrosobenzol im Blut. Bd.235, S. 350 ff. (1958)
- 11) Remmer : Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Entgiftung von Evipan und Thiopental bei Ratten. Bd. 233, S. 173 ff. (1958)
- 5) Uehleke : Biologische Oxydation und Reduktion am Stickstoff aromatischer Amino- und Nitroderivate und ihre Folgen für den Organismus. Arzneimittelforschung. Vol.8, S.215 ff. (1965)
- 7) Müller : Die enzymatische Reduktion aromatischer Nitrogruppen. Zeitschrift für physiologische Chemie Bd. 311, S. 155 ff. (1957)
- 8) Stahl : Dünnschichtchromatographie.
- 9) wie 4)
- 10) Glazko, Dill, Rebstock : Biochemical Studies on Chloramphenicol (Chloromycetin). Isolation and Identification of metabolic products in urine. J.of Biological Chemistry, Vol.183, S. 679 ff.(1949)
- 12) S. Otsuka : Studies on Nitro-Reducing Enzymes of Swine Liver. J. Biochemistry, Vol.50, S. 87 ff. (1961)
- 13) Uehleke : Nitrosobenzol und Phenylhydroxylamin als Zwischenstoffe der biologischen Reduktion von Nitrobenzol. Naturwissenschaften. Bd. 50, S.335. (1962)

14) wie 4)

16) wie 5) und 2)

17) wie 12)

18) wie 13) und 12)

19) wie 4) und 13)

20) Gattermann- : Die Praxis des organischen
Wieland Chemikers. S. 158 ff.

A N H A N G
(Tabellen)

Tab.1

Hexobarbitalabbau in $\mu\text{g/ml}$

a) bei sofortiger Inkubation

15'	30'	45'	60'	90'
13	20	35	30	34
13	18	26	29,5	34
	18	26	29	
	20		29,4	
	23		38	
	21,8		31	
	21,6		31	
	26		35	
	18		33	
	24		33	
	20		27	
	20		30	
	20		29,5	
	21,5		30,5	
	25,5		33,3	
	24,8		33	
	22		30	
Mittelwerte aus 12 Versuchen, mit Abweichungen in % vom Mittelwert				
$13 \pm 0\%$	$21,5 \pm 18,5\%$	$29 \pm 15,5\%$	$31,3 \pm 17,5\%$	$34 \pm 0\%$

b) nach 30' Vorinkubation in O_2 -Phase

15	22	29,7	32
13	20	26	33,4
	22	25,7	33
	19,7	26,7	30,7
	22,7		32
Mittelwerte aus 4 Versuchen, mit ... wie zuvor			
$14 \pm 7,1\%$	$21,28 \pm 7,4\%$	$27 \pm 6,8\%$	$32,2 \pm 4,19\%$

c) nach 30' Vorinkubation in N_2 -Phase

11	20	26	31
10	18,2	25	27,5
	18	22,5	27,5
		23,3	
Mittelwerte aus 3 Versuchen, mit ... wie zuvor			
$10,5 \pm 4,7\%$	$18,7 \pm 5,4\%$	$24,2 \pm 7,2\%$	$28,7 \pm 6,1\%$

d) nach 60' Vorinkubation in O_2 -Phase

20	33
12,5	37,8
	21
	21,5
Mittelwerte aus 2 Versuchen, mit ... wie zuvor	
$16,25 \pm 23\%$	$28,4 \pm 29,5\%$

e) nach 60' Vorinkubation in N_2 -Phase

13,3	21,5
13,5	21,3
Mittelwerte aus 1 Versuch, mit wie zuvor	
$13,4 \pm 0,7\%$	$21,4 \pm 0,4\%$

Tab.2

Hexobarbitalabbau in μ /ml nach 30 Minuten.
Mittelwerte und deren Abweichungen in %.

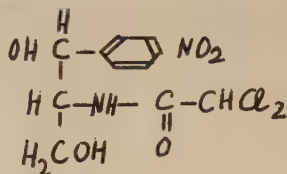
Milieu	Vorinkubationszeit		
	0' n=12	30' n=4	60' n=3
O ₂	21,5 ± 18,5%	21,28 ± 7,4%	16,25 ± 23%
N ₂	-	18,7 ± 5,4%	13,4 ± 0,7%

wie zuvor nach 60 Minuten.

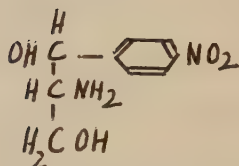
O ₂	31,3 ± 17,5%	32,2 ± 4,19%	28,4 ± 29,5%
N ₂	-	28,7 ± 6,1%	21,4 ± 0,4%

Testsubstanzen ad Tab. 3 bis 8.

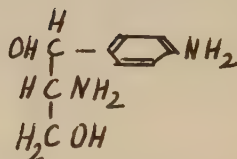
Chloramphenicol



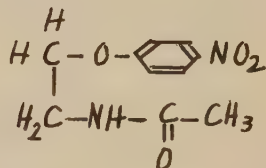
D-1-1-(p-Nitrophenyl)-2-amino-1,3-propandiol



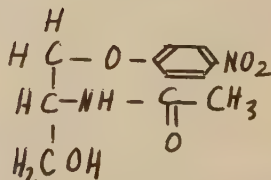
D-1-threo-1-(p-Aminophenyl)-2-amino-1,3-propandiol



α -Acetamido-p-Nitro-acetophenon



α -Acetamido- β -hydroxy-p-Nitropropiofenon



Nitrobenzol



Tab. 3

Prozentuale Hemmung des Hexobarbitalabbaus, 1 Stunde nach Injektion von 25 mg/kg Körpergewicht Chloramphenicol u.a. Testsubstanzen.

Testsubstanzen	n	15'	30'	45'	60'	90'
Chloramphenicol	1	74,6	62,2	45	53,3	57,3
Nitrophenyl-aminopropandiol	1	15,3	15	7,6	21,2	14,7
Acetamidonitroacetophenon	2	-	-	-	-	-
Acetamidohydroxynitropropiofenon	1		58,82	22,6	35,15	

Tab. 4

Hexobarbitalabbau in μ /ml und Prozent (ein Vergleich zur Kontrolle), 1 Stunde nach Injektion von 25 mg/kg Körpergewicht Chloramphenicol u.a. Testsubstanzen.

Testsubstanzen	n	15'	30'	45'	60'	90'
Chloramphenicol	1	3,3 = 26,4%	8,3 37,8%	14,3 55%	15,4 46,7%	14,5 42,7%
Nitrophenyl-aminopropandiol	1	11 = 84,7%	17 85%	24 92,4%	26 78,2	29 85,3%
Acetamidonitroacetophenon	2	M	21,5 100%	27,15 100%	29,2 100%	
Acetamidohydroxynitropropiofenon	1		7 41,18%	14,7 77,4%	17,5 64,84%	

Tab.5

Prozentuale Hemmung des Hexobarbitalabbaus bei gleichzeitiger Inkubation von Chloramphenicol u.a. Testsubstanzen.

Testsubstanzen	Dosis µg/Ansatz	n	15'	30'	45'	60'
Chloramphenicol	100	4		-		0
				-		3,4
				-		3,4
				-		6,6
				4,34		6,6
				8,7		10,3
				7,4		10,3
				8,2		13,3
				12,03		13,3
				12,8		15,93
				6,6		16,96
				16,6		
			M	6,39		9,1
	300	1		11,53	25,71	21,05
						21,05
Nitrophenyl-amino-propan-diol	100	2		0		3,03
				0		6,45
				5,05		8,5
				25		9,6
			M	7,51		6,89
Amino-phenyl-amino-propan-diol	100	1	18,5	0		0
						4,5
					M	2,25

Tab.6 Prozentuale Hemmung des Hexobarbitalabbaus nach 30' Vorinkubation von Chloramphenicol u.a. Testsubstanzen

Testsubstanzen	Dosis /Ansatz	n	15'	30'	O ₂	45'	60'	n	15'	30'	N ²	45'	60'
Chloramphenicol	100	3	44,61	18,69 19,54 20,32		3,84	15,15 15,55 15,75 17,77 20,83 22,91 28,73 33,33	2		23,1			33,5 34,48 44,11 42,5 48,27 55,88
Nitrophenylamino- propandiol	300	2	M	19,52 41,85		43,07	33,75	1	50	47,5		46,15	43,12 50 50
	100	1	M	58,38 50,12		58,36 50,72	59,6 46,68						36,84 15,79 26,31
	600	1		-		8,41	2,5	1		13,88	8,58	M	0 8,36
Aminophenylaminopropandiol	100	1	10	15,32		6,04	14,2	1					
Acetamidonitro- acetophenon	100	1	30,23	32,92		1,79	1,79	1		40			16,19 16,95 18,08 15,03 16,36 54,54 40,91 47,72
Acetamidohydroxy- nitropropiofenon	300	1		82,16 55,13 68,65		57,95	27,45	1		58,33	61,1	M	
	100	1	M	24,51 24,51		16,3	8,8	1		31,51 35,61 41,18 44,17			16,87 28,12
	300	2		58,06 51,42 54,74		44,2	50	1	M	38,25 34	23,08		22,49 47,37
Nitrobenzol	100	2	16,6	10,71		44,63	9,84	1		54,3	21,05		11,5
							20,45 15,15		M				

Tab.7

Prozentuale Hemmung des Hexobarbitalabbaus nach 30 Minuten Inkubationszeit.

Testsubstanzen	Dosis g/Ansatz	Milieu	Vorinkubationszeit mit Testsubstanz					
			n	0'	n	30'	n	60'
Chloramphenicol	100	O ₂	4	6,72	3	19,52	1	17,5
		N ₂			2	23,08		
	300	O ₂	1	11,53	2	50,12	1	88
		N ₂			1	47,5	1	100
Nitrophenylamino- propanediol	100	O ₂	2	7,51	1	-		
		N ₂			1	-		
	300	O ₂			1	-		
		N ₂			1	13,88		
	600	O ₂			1	15,32		
		N ₂			1	-		
Amino- phenyl- amino- propan- diol	100	O ₂	1	0	1	-		
Acet- amido- nitro- aceto- phenon	100	O ₂			1	32,92		
		N ₂			1	40		
	300	O ₂			1	68,65		
		N ₂			1	47,72		
Acet- amido- hydroxy- nitro- propio- phenon	100	O ₂			1	24,51		
		N ₂			1	38,25		
	300	O ₂			2	54,74		
		N ₂			1	34		
Nitro- benzol	100	O ₂			2	10,71		
		N ₂			1	21,05		

Tab.8

Prozentuale Hemmung des Hexobarbitalabbaus nach 60 Minuten Inkubationszeit.

Testsubstanzen	Dosis g/Ansatz	Milieu	Vorinkubationszeit mit Testsubstanz					
			n	0'	n	30'	n	60'
Chloramphenicol	100	O ₂	4	9,09	3	21,25	1	24,08
		N ₂			2	43,12		
	300	O ₂	1	21,05	2	46,68	1	69,88
		N ₂			1	50	1	73,12
Nitrophenylamino- propandiol	100	O ₂	2	6,89	1	-		
		N ₂			1	26,31		
	300	O ₂			1	2,5		
		N ₂			1	0		
	600	O ₂			1	14,2		
		N ₂			1	8,36		
Amino- phenyl- amino- propandiol	100	O ₂	1	2,25	1	1,79		
Acet- amido- nitro- aceto- phenon	100	O ₂			1	20,83		
		N ₂			1	16,56		
	300	O ₂			1	27,45		
		N ₂			1	47,72		
Acet- amido- hydroxy- nitro- propio- phenon	100	O ₂			1	8,8		
		N ₂			1	22,49		
	300	O ₂			2	50		
		N ₂			1	47,37		
Nitro- benzol	100	O ₂			2	15,15		
		N ₂			1	11,5		

Lebenslauf.

Am 21. Mai 1940 wurde ich als Tochter des Amtsgerichtsrats Dr. Hermann Knist und seiner Ehefrau Maria geb. Brunnen in Quakenbrück, Reg. Bezirk Osnabrück, geboren. Ich besuchte 4 Jahre die Grundschule in Bentheim, 1 Jahr die dortige Mittelschule und 8 Jahre eine Oberschule für Mädchen in Osnabrück - Haste, wo ich Ostern 1960 die Reifeprüfung ablegte. Danach nahm ich das Medizinstudium auf und absolvierte die vorklinischen Semester an den Universitäten Heidelberg, Münster und Gießen. Am 10. April 1963 bestand ich in Heidelberg das Physikum. Das erste klinische Semester verbrachte ich in Kiel, die weiteren sämtlich in Marburg.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren
Professoren und Dozenten in

Heidelberg: Hoepke, Haxel, Hoffmann, Seybold, Schäfer,
Schönfeld, Altmann, Wittig, Appel, Ferner,
Duspiva, Steudel, Kutscher, Kantner;
Münster : Schütz, Caspers, Lehnartz, Eichner,
Becher, Pfefferkorn;
Gießen : Rollhäuser, Graumann, Staudinger, Thauer;
Kiel : Merkel, Jansen, Gärtner, Bernsmeier,
Walter, Eufinger, Wulf;
Marburg : Gedigk, Schmid, Siess, Martini, Lang,
Schwaiger, Streicher, Würterle, Hartmann,
Hamm, Lang, Linneweh, Braun-Falco,
Salfeld, Siegert, Heuser, Beckmann, Straub,
Hornung, Jacob, Berendes, Mann, Sauer,
Dittrich, Exner, Schleyer, Hildebrandt,
Buchholz, Schrappe, Marx, du Mesnil de
Ronchement.

Im Oktober 1964 begann ich mit der Promotionsarbeit. Am 1. 9. 1966 bestand ich das Staatsexamen.

